

LEONARDO VICTOR BARBOSA PEREIRA

**Efeito protetor da N-Acetilcisteína sobre a nefrotoxicidade
de meios de contraste baseados no gadolínio em modelo
experimental de doença renal crônica**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos
Seguro

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Leonardo Victor Barbosa

Efeito protetor da N-Acetilcisteína sobre a nefrotoxicidade de meios de contraste baseados no gadolínio em modelo experimental de doença renal crônica / Leonardo Victor Barbosa Pereira. -- São Paulo, 2012.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.

Orientador: Antônio Carlos Seguro.

Descritores: 1.Gadolínio 2.Insuficiência renal crônica 3.Doença renal crônica
4.Meios de contraste 5.Toxicidade

USP/FM/DBD-006/12

Dedicatória

Dedico esta tese à minha família e amigos.

*Ao meu pai **Adilson Luciano** que sempre me apoiou e demonstrou um profundo orgulho com as conquistas da minha carreira. Obrigado meu pai, por tudo que me ensinou durante a vida.*

*À minha mãe **Maria Aparecida**, pelo carinho, amor e dedicação. Pessoa que me inspira a generosidade e bondade que o ser humano é capaz de demonstrar. Obrigado mãe! Amo você!*

*À minha irmã **Luciana**, pela amizade e companheirismo durante toda a nossa vida, sempre terá meu carinho, respeito e amor.*

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro, meu orientador, por ter paciência para ensinar os caminhos da pesquisa básica com toda a dedicação e carinho. Seu entusiasmo com o estudo e a pesquisa sempre foram fonte de inspiração.

À Dra. Maria Heloísa Massola Shimizu, minha co-orientadora, pelo carinho e ajuda imprescindíveis para realização desse sonho. Mais uma vez obrigado por tudo, considero-te uma grande amiga.

À Profa. Dra. Lúcia Conceição Andrade, pela ajuda na elaboração desta tese e do trabalho que ela gerou e pelo exemplo de pessoal e profissional.

Aos colegas do LIM-12, Dr. Rildo Aparecido Volpini, Dra. Talita Rojas Sanches, Dra. Ana Carolina de Bragança, pela paciência, carinho e ajuda. Obrigado por me ensinar os caminhos da pesquisa e a superar todas as dificuldades encontradas.

Aos funcionários do LIM-12, Ciça, Eloá e Nivaldo por terem me recebido com grande respeito e carinho desde o início da realização desse sonho.

À Profa. Dra. Claudia da Costa Leite, pela importante ajuda e apoio na elaboração deste trabalho.

À Profa. Dra. Claudia Maria de Barros Helou pelas palavras de incentivo e pela oportunidade de me transmitir conhecimento.

Aos meus colegas e amigos, Vinícius, Anna Rita e Daniel Mazzo pela ajuda e apoio na realização deste trabalho.

Normatização adotada

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Normas do Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, de janeiro de 2009.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

SUMARY

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	8
2.1. Medidas de gaiola metabólica:	10
2.1.1. Análise bioquímica:	10
2.1.2. Proteinúria 24 horas (mg/24hs):	11
2.2. Clearance de inulina:	11
2.3. Medidas da pressão arterial	12
2.4. Análise da cinética do ferro	12
2.5. Análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	13
2.6. Análise estatística	13
3. RESULTADOS	14
3.1. Ratos normais	15
3.2. Ratos nefrectomizados	15
3.2.1. Análise bioquímica	16
3.2.2. Taxa de filtração glomerular	177
3.2.3. Proteinúria 24 horas	19

3.2.4. Pressão arterial	21
3.2.5. Cinética do Ferro	21
3.2.5.1. Ferro sérico	21
3.2.5.2. Ferritina sérica	22
3.2.5.3. Saturação de transferrina	23
3.2.5.4. Capacidade total de ligação do ferro.....	25
3.3. TBARS plasmático.....	27
4. DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS

Clcreatinina	Clearance de creatinina
Cr	Creatinina
CTLF	Capacidade total de ligação do ferro
Cu ⁺⁺	Íon cobre
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EPM	Erro padrão
Fe ⁺⁺⁺	Íon férrico
Fe ⁺⁺	Íon ferroso
FeNa	Fração de excreção de Sódio
FNS	Fibrose Sistêmica Nefrogênica
Gd	Gadolínio
IRC	Insuficiência Renal Crônica
IRA	Insuficiência Renal Aguda
n	Refere-se a quantidade total de um grupo
Na	Íon sódio
NAC	N-Acetilcisteína
Nx	Ratos controle submetidos a nefrectomia 5/6
Nx+Gd	Ratos que receberam somente Gadolínio
Nx+Gd+NAC	Ratos que receberam Gadolínio e N-Acetilcisteína
Nx+ NAC	Ratos que receberam somente N-Acetilcisteína
PTH	Paratormônio
Ptn 24hs	Proteinúria 24 horas
TBARS	Substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico
TFG	Taxa de filtração glomerular
UV	Medida quantitativa de determinado elemento na urina
Zn ⁺⁺	Íon zinco

LISTAS DE SÍMBOLOS

%	por cento
±	mais ou menos
+	mais
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
>	maior
<	menor
=	igual
:	indica razão entre duas grandezas
®	marca registrada
g/dl	gramas por decilitro
Hs	horas
mg/dl	miligramas por decilitro
mg/kg	miligramas por quilo
mg/l	miligramas por litro
mg/24 hs	miligramas por vinte e quatro horas
mg/dia	miligramas por dia
ml	mililitros
ml/min	mililitros por minuto
ml/min/100g	mililitros por minuto por cem gramas de peso
mmHg	milímetros de mercúrio
mmol/kg	milimol por quilo
μg/dl	microgramas por decilitro
ng/dl	nanogramas por decilitro
nm	nanômetros
<i>p</i>	nível descritivo de probabilidade estatística
<i>vs</i>	versus

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados de Clearance de inulina, proteinúria e pressão arterial de ratos normais.....	15
Tabela 2. Dados referentes a diurese de 24hs, osmolaridade, UV de sódio, fração de excreção de sódio e pressão arterial dos ratos pertencentes aos grupos Nx, Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC	16

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Taxa de Filtração glomerular (TFG) avaliada pelo clearance de inulina nos grupos Nx, Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC.	18
Gráfico 2: Proteinúria de 24 horas dos ratos Nx, Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC antes dos experimentos de clearance.....	20
Gráfico 3: Dosagens de ferritina sérica dos grupos Nx, Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC.	22
Gráfico 4: Dosagem da saturação de transferrina nos grupos Nx,Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC.....	24
Gráfico 5: Dosagem da CTLF nos grupos Nx,Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC... ..	26
Gráfico 6: Dosagem do TBARS plasmático nos grupos Nx,Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC.	28

Resumo

Pereira, LVB. *Efeito protetor da N-Acetilcisteína sobre a nefrotoxicidade de meios de contraste baseados no gadolínio em modelo experimental de doença renal crônica*[tese] . São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 41p.

INTRODUÇÃO: O Gadolínio (Gd) é um raro metal da classe dos lantanídeos usado como meio de contraste devido as suas propriedades paramagnéticas. Após sua descoberta, foi considerado um contraste pouco nefrotóxico em pacientes com doença renal crônica (DRC). Atualmente, existem evidências de que o Gd pode apresentar nefrotoxicidade semelhante aos contrastes iodados. A administração de Gadolínio em ratos com DRC pode levar a piora da função renal aferida por clearance de inulina e mobilização do ferro corporal gerando stress oxidativo.

OBJETIVOS: O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do Gd na função renal, nos parâmetros de cinética do ferro em ratos com DRC e o possível efeito protetor do anti-oxidante N-Acetilcisteína (NAC).

MATERIAIS E MÉTODOS: Ratos Wistar machos foram submetidos à nefrectomia 5/6 (Nx) para induzir DRC. Gadoterate Meglumine, um contraste à base de Gadolínio iônico e macrocíclico foi administrado via intravenosa na dose de 1,5mmol/kg de peso de rato 21 dias após a nefrectomia. Para avaliar o efeito do Gd sobre a função renal, estudos de clearance de inulina foram realizados em 4 grupos de ratos 48 hs após a aplicação do Gd: grupo controle 1- Nx (n=7); 2- Nx+NAC (n=6); 3- Nx+Gd (n=8); 4- Nx+Gd+NAC (n=5). O NAC foi administrado no grupo 4 diluído em água 48 hs antes e 48 hs depois da administração do Gd na dose de 4800mg/l. O grupo 2 recebeu NAC durante o mesmo período de tempo do grupo 4. O Gd também foi administrado em ratos com função renal normal, grupo Normal (n=8) na mesma dose dos grupos nefrectomizados com avaliação da função renal e proteinúria. Além da taxa de filtração glomerular (TFG), foram avaliados: proteinúria de 24hs (ptn), parâmetros de gaiola metabólica, pressão arterial (PA), parâmetros de cinética do ferro representados pelo ferro sérico (Fe), capacidade total de ligação do ferro (CTLF), saturação de transferrina, ferritina sérica e stress oxidativo por meio da dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA utilizando o programa Graph Prism com nível de significância $p < 0,05$ e erro padrão.

RESULTADOS: A aplicação de Gd em ratos nefrectomizados resultou em queda na TFG no grupo 3 em relação ao grupo controle 1 ($p < 0,01$). Houve uma tendência de aumento da ptn no grupo 3 em relação aos demais grupos. O grupo 4 que recebeu tratamento com NAC apresentou TFG e ptn semelhante ao grupo 1 e TFG estatisticamente maior que o grupo 3 ($p < 0,05$). Com relação ao grupo de ratos normais não houve alteração da TFG nem aumento de ptn após a aplicação do Gd em relação à ratos não nefrectomizados que não receberam contraste. Com relação aos parâmetros da cinética do ferro, o grupo 3 apresentou elevação da ferritina e da saturação da transferrina comparados ao grupo 1 ($p < 0,05$) e ($p < 0,01$) respectivamente. Houve diminuição da capacidade total de ligação do ferro (CTLF) no grupo 3 comparado ao grupo 1 ($p < 0,01$). O uso profilático do NAC no grupo 4 reverteu todas as alterações descritas anteriormente no grupo 3 com significância estatística ($p < 0,05$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,01$) respectivamente. Com relação ao stress oxidativo, o grupo 3 apresentou níveis de TBARS significativamente maiores que o grupo 1 ($p < 0,05$). O grupo 4 apresentou níveis de TBARS

semelhantes ao grupo 1 e menores que o grupo 3 ($p < 0,05$). O grupo 2 que recebeu apenas NAC por curto período de tempo apresentou TFG, Ptn e parâmetros de cinética de ferro semelhantes aos grupos 1 e 4. Com relação aos dados de gaiola metabólica e pressão arterial não houve diferença estatística entre os grupos 1,2,3 e 4. CONCLUSÕES: Os resultados mostram que a administração de Gd em ratos nefrectomizados resulta em diminuição da TFG, aumento da proteinúria associado a aumento da ferritina sérica, saturação de transferrina e diminuição da CTLF. Em ratos normais o Gd não mostrou ser nefrotóxico e o uso do NAC isoladamente no grupo 2 por curto período de tempo não demonstrou nenhum efeito, pois todos os parâmetros avaliados foram semelhantes ao grupo controle. Indução de stress oxidativo foi representado pelo aumento do TBARS nos ratos que receberam o Gd. O uso de NAC reverteu todas as alterações provocadas pelo Gd. Concluímos que o NAC pode ser usado como profilaxia da toxicidade associada ao Gd.

Descritores: 1. Gadolínio 2. Doença renal crônica 3. Meios de contraste
4. Toxicidade

Summary

Pereira, LVB. *Protective effect of N-acetylcysteine on the nephrotoxicity of contrast media based on gadolinium in an experimental model of chronic kidney disease* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2011. 41p

INTRODUCTION: Gadolinium (Gd) is a rare class of lanthanide metal used as a contrast agent due to its paramagnetic properties. After its discovery, was considered a bit of contrast nephrotoxicity in patients with chronic kidney disease (CKD). Currently, there is evidence that Gd may present similar to iodine contrast media nephrotoxicity. The administration of Gadolinium in rats with CKD can lead to worsening renal function measured by inulin clearance and mobilization of iron body causing oxidative stress. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to evaluate the effect of Gd on renal function, iron parameters and oxidative stress in rats with CKD and a possible effect of antioxidant N-Acetylcysteine (NAC). **MATERIALS AND METHODS:** Male Wistar rats underwent nephrectomy 5/6 (Nx) to induce CKD. Gadoterate meglumine, a Gadolinium based contrast ionic and macrocyclic was administered intravenously at a dose of 1.5 mmol / kg BW of rats 21 days after nephrectomy. To evaluate the effect of Gd on renal function, inulin clearance studies were performed in 3 groups of animals 48 hours (hs) after application of Gd: a control group 1 - Nx (n=7), 2- Nx+NAC (n=6); 3- Nx+Gd (n=8) e 4- Nx+Gd+NAC (n=5). The NAC was administered in group 4, diluted with water 48 hs before and 48 hs after administration of gadolinium at a dose of 4800mg / l. Group 2 received NAC four days before clearance study. Gd was also administered in rats with normal renal function, group normal (n=8) at the same dose of nephrectomized rats with assessment of renal function and proteinuria. In addition to the glomerular filtration rate (GFR) were evaluated: 24 hours proteinuria (ptn), cage metabolic parameters, blood pressure (BP), serum iron (Fe), total capacity of iron binding (TIBC), transferrin saturation, serum ferritin and oxidative stress through measurement of thiobarbituric acid reactive species (TBARS). Data were submitted to ANOVA using the program Prism Graph with a significance level $p < 0.05$ and standard error. **RESULTS:** Gd administration to group 3 results in a decrease of GFR compared with group 1 ($p < 0,01$). There was a trend of increase ptn in group 3 compared to other groups. Normal rats treated with the same dose of Gd presented similar GFR and proteinuria when compared with normal controls. In group 3, there was a decrease in TIBC, elevation of ferritin serum levels, transferrin oversaturation and plasmatic TBARS elevation compared with group 1 ($p < 0,01$), ($p < 0,05$), ($p < 0,01$) and ($p < 0,05$) respectively. The treatment with NAC in group 4 reversed the decreased in GFR and proteinuria compared with group 3 ($p < 0,05$) for both variables. Treatment with NAC in group 4 also reversed all alterations in iron parameters and oxidative stress described earlier with statistical significance ($p < 0,01$), ($p < 0,05$), ($p < 0,01$) and ($p < 0,05$) respectively. Group 2 received NAC for a short period of time had GFR, Ptn and kinetic parameters of iron similar to groups 1 and 4. With respect to metabolic cage data and blood pressure showed no statistical difference between groups 1,2,3 and 4. **CONCLUSIONS:** These results show that Gd administration to nephrectomized rats results in a decrease of GFR and increased proteinuria associated with increased serum ferritin and transferrin saturation with decreased TIBC. In normal rats, Gd was not nephrotoxic. These effects were not due to a possible effect of NAC on Nx, since all parameters measured in group 2 were

not different from the group 1. There was induction of oxidative stress represented by the increase in TBARS in rats receiving gadolinium. The use of NAC reversed all these changes caused by Gd. We conclude that the NAC can be used as prophylaxis of toxicity associated with Gd.

Descriptors: 1. Gadolinium 2. Chronic kidney disease 3. Contrast media
4. Toxicity 5. Gadoterate meglumine

1. Introdução

O gadolínio (Gd) é um raro metal paramagnético da série dos lantanídeos com número atômico de 64 e peso molecular de 157 Daltons (Da). É usado como meio de contraste devido as suas propriedades paramagnéticas (extremamente atraído por campos magnéticos) o que aumenta a qualidade das imagens nos exames de ressonância magnética¹.

Em sua forma livre, o gadolínio é extremamente tóxico. É um potente inibidor dos canais de cálcio com considerável toxicidade cardiovascular e neurológica. Pode se depositar no fígado, ossos e linfonodos e uma vez nesses tecidos apresenta uma taxa de excreção bastante lenta, cerca de 1% ao dia¹.

Para uso em humanos o gadolínio deve estar associado à quelantes, grandes moléculas orgânicas que aumentam a solubilidade do metal na água e o deixa em uma forma inerte, reduzindo sua toxicidade. Nos EUA existem cinco contrastes aprovados pelo FDA para uso em exames de Ressonância Magnética e aproximadamente 26.9 milhões de exames foram realizados em 2006 e atualmente mais de 200 milhões de pacientes no mundo foram expostos a contrastes paramagnéticos. O FDA aprovou a dose de 0,1 mmol/kg para uso em humanos, mas apenas em exames de ressonância sem estudo vascular. Não há padronização de doses para os contrastes paramagnéticos em exames de angioressonância e arteriografias. O uso do Gd nestes exames ainda não está aprovado pelo FDA¹.

Apesar da grande variedade de contrastes à base de Gd, a farmacocinética é bastante similar. Os compostos são solúveis em água, excretados de forma inalterada por filtração glomerular, não sofrem biotransformação e apresentam boa distribuição no fluido extracelular com rápido equilíbrio entre os compartimentos intravascular e intersticial. A meia vida dos contrastes à base de gadolínio em pacientes com função

renal normal é de aproximadamente 1h e 30 minutos e mais de 90% da droga é excretada em 24 horas². Existem 3 tipos de contraste que fazem exceção a essa regra, que são o Ácido Gadoxético (Primovist) que é metabolizado pelos hepatócitos e excretado 50% nas fezes; o Gadofosveset Trisodium (Vasovist) que apresenta alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas (80-96%) e o Gadobenate dimeglumine que também apresenta captação hepática e excreção fecal de aproximadamente 4%³. Estudos em pacientes com Insuficiência Renal Crônica (IRC) demonstram a importância da função renal na excreção do gadolínio. Pacientes com doença renal estágio III (Clcr 31-60 ml/min) apresentam uma meia vida média de excreção do contraste de aproximadamente 5,6 horas. Pacientes no estágio IV (Clcr 15-30 ml/min) apresentaram meia vida de 9,2 horas. Em pacientes no estágio V, não dialíticos, a meia vida de eliminação pode chegar até 34,3 horas. Devido ao baixo peso molecular e baixa ligação protéica, os contrastes à base de gadolínio apresentam uma boa remoção pela diálise convencional. A diálise peritoneal não é um método efetivo para retirar o gadolínio sendo que um estudo mostrou uma meia vida média de eliminação de 52,7 hs em pacientes submetidos à diálise peritoneal⁴.

As diferenças em relação aos efeitos dos vários compostos à base de gadolínio são atribuídas à capacidade de dissociação do seu quelante. Com base nessa característica, os compostos podem ser classificados em 4 grandes categorias baseados na sua estrutura bioquímica (linear ou cíclica) e na sua carga (iônica e não iônica). Os compostos macrocíclicos apresentam maior afinidade do gadolínio pelo seu quelante comparado aos compostos lineares e, portanto, apresentam maior estabilidade e menores taxas de dissociação tanto in vitro como in vivo. Os contrastes também apresentam ampla variação de osmolaridades (630 mOsm/l a

1970 mOsm/l) que são influenciadas pela carga. Compostos não iônicos geralmente apresentam osmolaridades mais baixas em relação aos compostos iônicos. Apesar dessas características iônicas e bioquímicas diferentes, não há prejuízo na realização das imagens entre os vários tipos de contrastes paramagnéticos⁵.

Essas características físico-químicas do Gd são importantes porque foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* que alguns cátions presentes no organismo como o Fe⁺⁺, Zn⁺⁺ e Cu⁺⁺ tem a capacidade de deslocar o Gadolínio do seu quelante expondo o metal (Gd) em sua forma livre e altamente tóxica. Esse fenômeno recebeu o nome de Transmetalção e ocorreria de forma bastante acentuada em pacientes com IRC, devido à meia vida bastante prolongada do contraste. A Transmetalção ocorreria através da reação de Fenton que envolve participação de radicais livres e stress oxidativo⁶.

Estudos *in vitro* e em pacientes com IRC demonstraram que a aplicação do Gd leva a uma mobilização do Ferro corporal que pode ser avaliada pelos parâmetros de cinética do ferro. Em pacientes com IRC foi demonstrado que a aplicação do gadolínio leva a uma diminuição da Capacidade total de ligação do ferro (CTLF), aumento da ferritina sérica e da saturação da transferrina. Essas alterações podem ser resultado da Transmetalção que ocorreria de maneira mais acentuada em pacientes com IRC⁷. Estas evidências serviram como base para avaliação dos parâmetros da cinética do ferro em nosso estudo e avaliar o comportamento destes parâmetros após o uso profilático do NAC.

Os exames de imagem com contrastes paramagnéticos foram frequentemente usados no lugar dos contrastes iodados naqueles pacientes de alto risco para desenvolver nefropatia associada aos contrastes iodados, como pacientes portadores

de DRC, Diabetes e cardiopatas. Por muitos anos, os contrastes à base de gadolínio foram considerados altamente seguros inclusive nos pacientes com risco elevado de desenvolver nefropatia pelos contrastes iodados. Estudos mais antigos mostraram que o gadolínio não estava associado ao risco de piora da função renal mesmo em pacientes com DRC. Mas esses estudos apresentavam limitações importantes como, falta de grupos controle, número pequeno de pacientes envolvidos no estudo, doses variáveis de contraste e definições diferentes de nefropatia^{8,9}.

Estudos mais recentes mostraram um aumento no risco de insuficiência renal aguda associado ao uso do gadolínio em pacientes com DRC. Estes estudos incluíram mais pacientes, um estudo foi prospectivo e as doses usadas eram em média maiores do que aquelas utilizadas em estudos anteriores^{10,11}. Houve um caso relatado, comprovado por biópsia, mostrando necrose tubular aguda associado ao gadolínio, similar ao padrão encontrado na nefropatia associada aos contrastes iodados¹².

Existem dúvidas se a nefrotoxicidade dos contrastes paramagnéticos ocorre devido ao gadolínio em sua forma metálica ou ao seu quelante. Um estudo mostrou que o Gd tem a capacidade de induzir apoptose em células tubulares renais semelhante aos contrastes iodados¹³. Como ambos os contrastes podem causar necrose tubular aguda, seria prudente evitar altas doses de gadolínio e manter um adequado estado de hidratação em pacientes com fatores de risco para nefropatia, principalmente aqueles com DRC. Deve-se comentar também que não há estudos detalhados sobre a nefrotoxicidade do gadolínio relacionando doses diferentes com o grau de nefropatia, nem com diferentes níveis de osmolaridade. Em 2002, The European Society of Urogenital Radiology recomendou, com base nos dados mais

recentes sobre nefrotoxicidade do Gd, não utilizar contrastes paramagnéticos em pacientes com DRC terminal para substituir os contrastes iodados¹⁴.

N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante sem efeitos colaterais importantes utilizado amplamente como profilaxia da nefropatia induzida por contrastes iodados. O principal mecanismo antioxidante do NAC seria sua capacidade de suprir, através da sua metabolização no aminoácido Cisteína, os estoques celulares de Glutathione, substância fundamental na proteção contra lesões induzidas por stress oxidativo. O NAC também possui efeito vasodilatador promovido pela estabilização do metabolismo do Óxido Nítrico e por uma inibição da síntese de Angiotensina 2 demonstrada em alguns estudos^{15,16,17,18}.

Atualmente, a grande preocupação de nefrologistas e radiologistas em relação à toxicidade do gadolínio é a Fibrose Nefrogênica Sistêmica (FNS), uma doença grave e incapacitante, caracterizada pelo desenvolvimento de uma dermopatia fibrosante crônica que ocorre exclusivamente em pacientes com DRC, principalmente nos pacientes submetidos à diálise. Estudos experimentais e in vivo sugerem que o Gd depositado nos tecidos em sua forma livre, liberado através do fenômeno da Transmetalção, seria responsável pela toxicidade e desenvolvimento da doença em pacientes com DRC^{19,20,21}. Essa doença foi inicialmente observada em 1997 e até fevereiro de 2007 já haviam sido descritos mais de 200 casos. A gravidade da doença e a falta de tratamento efetivo levaram a grandes mudanças e restrições no uso do gadolínio em pacientes com DRC.

O objetivo do nosso estudo foi avaliar a toxicidade dos contrastes à base de gadolínio sobre a função renal, parâmetros de cinética do ferro e indução de stress oxidativo em ratos com DRC pela avaliação do TBARS (Substâncias reativas ao

Ácido Tiobarbitúrico) urinário e estudar um possível efeito protetor da N-Acetilcisteína sobre a toxicidade produzida pelo gadolínio.

2. Materiais e métodos

Para a realização do projeto utilizamos ratos Wistar machos com peso entre 180-210 gramas fornecidos pelo biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Inicialmente avaliamos o efeito do Gd em ratos normais, grupo No+Gd (n=8) injetando 1,5 mmol/kg de Gadoteridol na veia caudal sob anestesia com tribromoetanol 2,5% intraperitoneal e avaliação do clearance de inulina 48 horas após a aplicação do Gd. Todos os demais animais foram submetidos à nefrectomia do tipo 5/6, simulando uma situação de risco para nefropatia relacionado a contrastes radiológicos. O contraste utilizado para os experimentos foi o Gadoterato Meglumine, composto iônico e de estrutura macrocíclica. Após 21 dias da cirurgia, os animais foram alocados em 4 grupos de experimento:

Grupo 1 (Nx) - grupo controle; ratos nefrectomizados (n=7) que não receberam N-Acetilcisteína nem contraste à base de gadolínio.

Grupo 2 (Nx+NAC) - ratos nefrectomizados (n=6) que receberam N- Acetilcisteína 4 dias antes da realização dos estudos de clearance de inulina.

Grupo 3 (Nx+Gd) - ratos nefrectomizados (n=8) submetidos à injeção de 1,5 mmol/kg de Gadoteridol na veia caudal sob anestesia com tribromoetanol 2,5% intraperitoneal.

Grupo 4 (Nx+Gd+NAC) - ratos nefrectomizados (n=5) submetidos à injeção de 1,5 mmol/kg de Gadoteridol na veia caudal sob anestesia com tribromoetanol 2,5% intraperitoneal; durante 48 horas antes da injeção e 48 horas após a aplicação do contraste os ratos receberam profilaxia com N-Acetilcisteína por via oral (4800mg/ l) diluído em água.

No grupo 1 o experimento do clearance de inulina foi realizado 21 dias após a nefrectomia. Nos grupos 3 e 4 o clearance foi realizado 48 hs após a aplicação do Gadolínio.

2.1- Medidas de gaiola metabólica:

2.1.1. Análise bioquímica:

Os animais foram colocados em gaiola metabólica 24 horas após a injeção do gadolínio (grupos 3 e 4) e 48 horas após o início da ingestão de NAC (grupo 4) com o objetivo de manter os ratos com o mesmo tempo de uso de NAC e com o mesmo tempo de nefrectomia após as intervenções. Nas gaiolas metabólicas, os animais tiveram livre acesso à água, sendo que os ratos dos grupos 2 e 4 receberam NAC nas gaiolas. Todos os grupos permaneceram na gaiola metabólica por 24 horas. A urina foi coletada para dosagens de Sódio (Na), creatinina (Cr) urinária, osmolalidade e UV Na. No plasma foram dosados Na e Cr para cálculo da fração de excreção de Sódio (FeNa).

2.1.2. Proteinúria 24 horas (mg/24hs):

A urina coletada na gaiola metabólica foi utilizada para dosagem da proteína urinária total utilizando o método de vermelho de pirogalol. Foi utilizado o teste Sensiprot da Labtest Diagnóstica®, através do qual a amostra de urina foi misturada a um reagente de cor que contém pirogalol. A quantificação da proteinúria foi feita através de método espectrofotométrico a partir da relação entre a absorbância da amostra e da solução padrão (50 mg de proteína/dL).

2.2. Clearance de inulina:

Após a coleta da urina de 24 horas, os ratos foram submetidos à mensuração do clearance de inulina. Os ratos foram anestesiados com tiopental 50 mg/kg e submetidos à cateterização da veia jugular direita com cateter PE60, da artéria carótida esquerda com cateter PE50 e da bexiga com cateter PE 240. Um priming de inulina (100mg/kg) foi administrado, com posterior infusão constante de inulina a uma velocidade de 0,04 ml/min. Após trinta minutos foi feita a coleta de sangue inicial. A urina foi colhida em três períodos de trinta minutos. Ao final desses períodos o sangue do animal foi retirado para medir a concentração de inulina final e realizado as demais dosagens plasmáticas. Os plasmas obtidos foram desproteinizados em uma diluição de 0,1ml em 1ml de solução de ácido perclórico a 5% antes da dosagem da inulina por método espectrofotométrico. As urinas coletadas

foram diluídas em dois momentos: primeira diluição 1:11 em água destilada e a segunda diluição calculada a partir da concentração de inulina plasmática. A espectrofotometria foi usada para medir as concentrações de inulina. No cálculo da inulina, quer urinária ou plasmática, foi usado um fator de correção encontrado a partir da curva padrão de inulina, obtida por dosagens seriadas de diferentes concentrações de inulina pelo investigador direto do protocolo. O clearance de inulina foi calculado a partir da razão inulina urinária sobre a plasmática. A pressão arterial carotídea foi medida no início experimento. A unidade utilizada para a medida do clearance foi em ml/min/ 100g de peso de rato.

2.3. Medidas da pressão arterial

Antes do início dos experimentos de clearance os ratos foram submetidos à cateterização da artéria carótida com PE-60 para aferição da pressão arterial por manômetro de mercúrio.

2.4. Análise da cinética do ferro

Para avaliar o efeito do gadolínio nos parâmetros da cinética do ferro realizamos dosagens séricas da Capacidade Total de Ligação do Ferro (g/dl), Ferritina sérica

(ng/dl), saturação da Transferrina (%) e ferro sérico ($\mu\text{g/dl}$) 48 horas após a aplicação do Gd nos grupos 3 e 4. Nos grupos 1 e 2 as dosagens foram realizadas após o clearance de inulina.

2.5. Análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Para avaliar a participação do stress oxidativo foi dosado no plasma dos ratos o TBARS, um marcador de peroxidação lipídica, utilizando o método do ácido tiobarbitúrico, diluindo 0,4ml de plasma em 0,6 de água acrescida de 1ml de ácido tricloroacético 17,5% e depois adicionado ácido tiobarbitúrico 0,6% sendo a amostra aquecida em banho fervente por 15 minutos. Depois de resfriada, foi acrescentado as amostras 1 ml de ácido tricloroacético 70% sendo a amostra centrifugada e submetida a leitura em espectrofotômetro com absorvância de 534 nm. Os níveis plasmáticos de TBARS foram expressos em mmol/ml.

2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA (one-way analysis of variance) utilizando o programa de análise estatística Graph-Pad Prism. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$ e apresentado o erro padrão.

3. Resultados

3.1 Ratos normais

O grupo de ratos normais submetidos à aplicação do Gd não apresentaram diferenças com relação à TFG, proteinúria de 24 horas e pressão arterial comparados com ratos normais não submetidos à intervenção terapêutica (Tabela 1). Esses resultados mostram que o Gd não foi nefrotóxico em ratos com função renal normal.

Tabela 1. Resultados de Clearance de inulina, proteinúria e pressão arterial de ratos normais

Grupo	Clearance de inulina (ml/min/100g)	Proteinúria 24hs (mg/dia)	Pressão arterial (mmHg)
Normal	0,886±0,057	4,7±1	129±5
Normal+Gd	0,822±0,054	5,9±1	126±4

Dados expressos como media ± EPM.

3.2 Ratos nefrectomizados

Resultados referentes aos grupos 1, 2, 3 e 4:

3.2.1. Análise bioquímica

Os dados de gaiola metabólica e parâmetros bioquímicos colhidos das amostras de urina de 24hs (diurese, osmolaridade urinária, UV de sódio e fração de excreção de sódio) não mostraram diferenças significativas entre os grupos Nx, Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC (Tabela 2). A dose média de NAC ingerida pelo grupo 2 foi de 99 ± 9 mg/dia e pelo grupo 4 foi de 73 ± 10 mg/dia.

Tabela 2. Dados referentes a diurese de 24hs, osmolaridade, UV de sódio, fração de excreção de sódio e pressão arterial dos ratos pertencentes aos grupos Nx, Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC

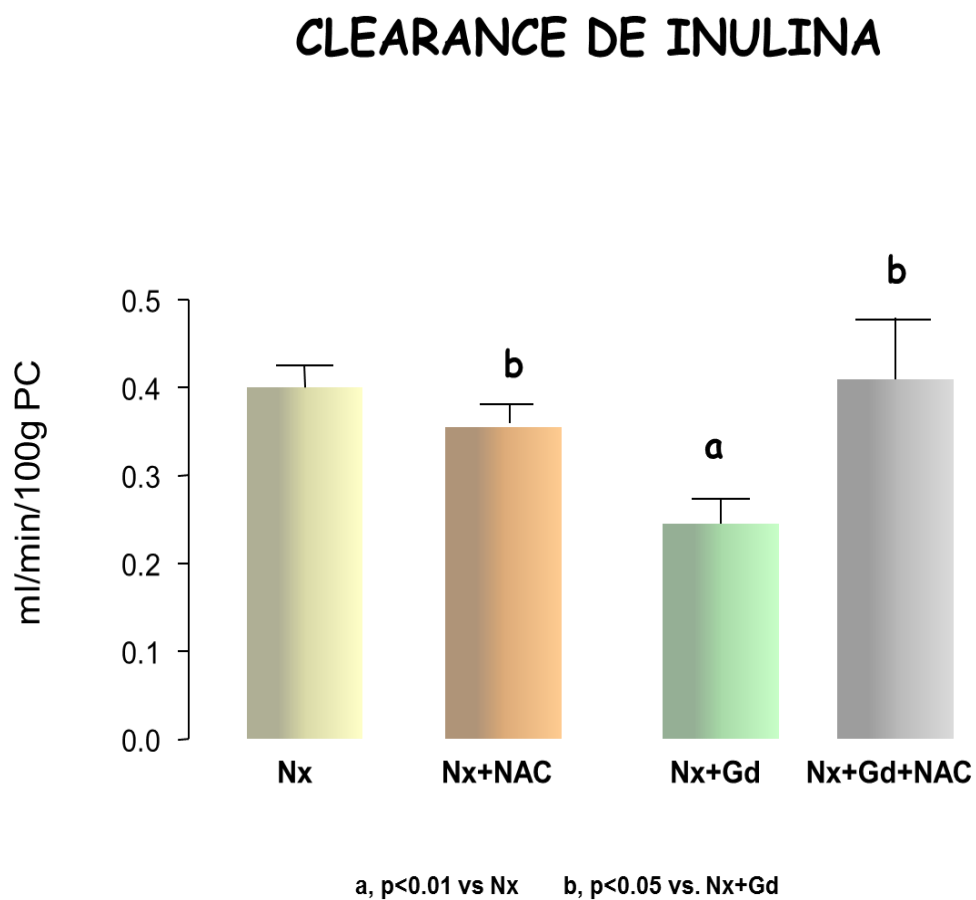
	Diurese 24hs (ml)	Osmolaridade (mos/l)	UV sódio (meq/24hs)	FeNa (%)
Nx	$15,4 \pm 2,9$	981 ± 70	$0,30 \pm 0,07$	$0,36 \pm 0,14$
Nx+NAC	$17,2 \pm 2,2$	882 ± 65	$0,40 \pm 0,15$	$0,39 \pm 0,07$
Nx+Gd	$22,5 \pm 4,3$	771 ± 119	$0,57 \pm 0,1$	$0,34 \pm 0,13$
Nx+Gd+NAC	$16,5 \pm 1,8$	952 ± 191	$0,54 \pm 0,09$	$0,37 \pm 0,09$

Dados expressos como media \pm EPM.

3.2.2 Taxa de filtração glomerular

Nossos estudos funcionais avaliados pelo clearance de inulina mostraram queda significativa da taxa de filtração glomerular (TFG) no grupo Nx+Gd (grupo 3) em relação ao grupo controle Nx (grupo 1) 48 hs após a aplicação do Gadolínio. O grupo controle Nx apresentou TGF média de 0.400 ± 0.025 ml/min/100g de rato enquanto o grupo Nx+Gd apresentou TFG média de 0.245 ± 0.028 ml/min/100g de rato ($p < 0,01$). O grupo Nx+Gd+NAC (grupo 4) apresentou uma TGF média de 0.410 ± 0.069 ml/min/100g de rato 48hs após a aplicação do contraste evidenciado o efeito protetor do NAC na piora da função renal associada a aplicação do gadolínio em relação ao grupo Nx+Gd ($p < 0,05$); O grupo Nx+NAC (grupo 2) apresentou TFG média de $0,35 \pm 0,021$ ml/min/100g de rato, sem diferença estatística entre os grupos 1 e 4, demonstrando que o NAC utilizado por períodos curtos não altera a filtração glomerular (Grafico 1).

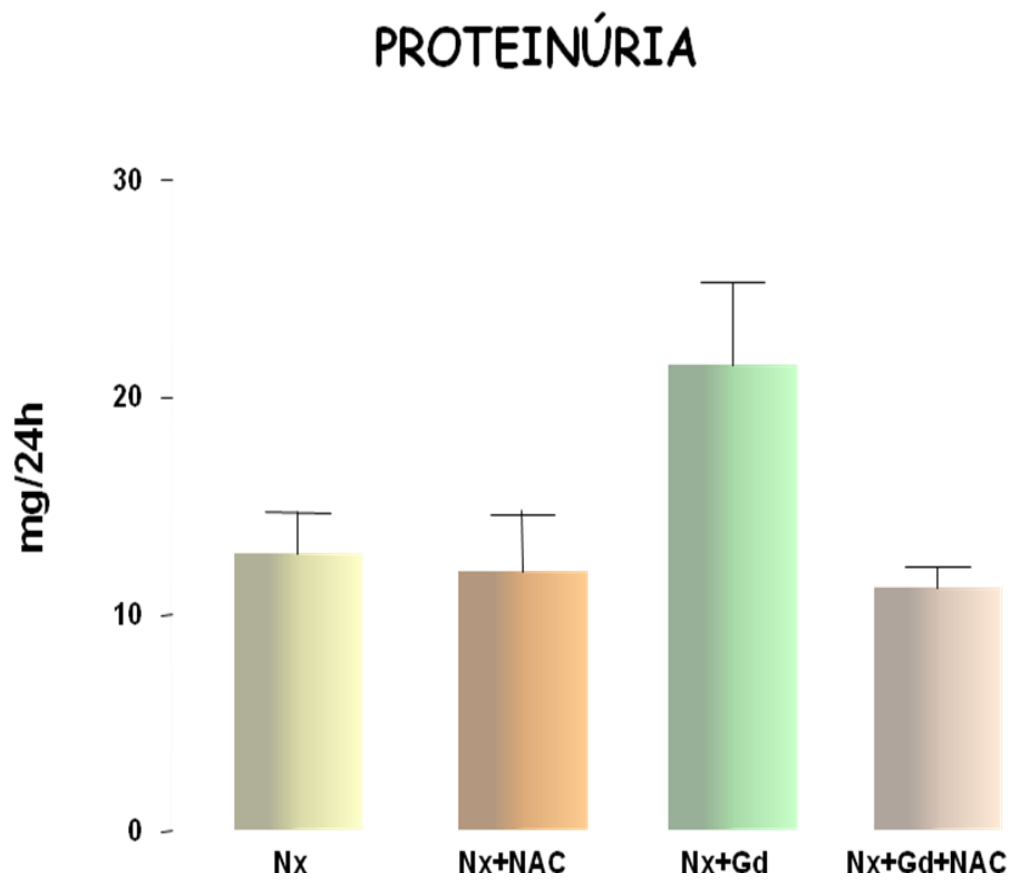
Gráfico 1: Taxa de Filtração glomerular (TFG) avaliada pelo clearance de inulina nos grupos Nx, Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC. Os dados são expressos como média \pm EPM. **a** $p < 0,01$ vs NX; **b** $p < 0,05$ vs Nx+Gd



3.2.3. Proteinúria 24 horas

Nossos resultados mostraram que o grupo Nx+Gd apresentou maior proteinúria de 24hs (Ptn 24hs) em relação a todos os outros grupos. O grupo Nx+Gd apresentou uma taxa média de Ptn 24hs de 21.5 ± 3.8 mg/24hs, o grupo Nx apresentou uma taxa de 12.8 ± 1.9 mg/24hs, o grupo Nx+NAC apresentou taxa de $12,9 \pm 2,6$ mg/24hs e o grupo Nx+Gd+NAC apresentou taxa de 11.2 ± 1.0 mg/24hs. Apesar da análise ANOVA demonstrar uma tendência de elevação da proteinúria no grupo Nx+Gd, o pós teste Newman Kells não mostrou significância estatística. Mas o uso de NAC por curtos períodos não modificou a proteinúria nos grupos Nx+NAC e Nx+Gd+NAC em relação ao grupo controle (gráfico 2).

Gráfico 2: Proteinúria de 24 horas dos ratos Nx, Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC antes dos experimentos de clearance.



3.2.4. Pressão arterial

O grupo Nx+Gd apresentou níveis de pressão arterial sistólica média de $170 \pm 7,5$ mmHg. O grupo Nx apresentou níveis pressóricos de $163 \pm 8,1$ mmhg, o grupo Nx+NAC 160 ± 12 mmhg, sem diferença em relação ao grupo Nx+Gd. O grupo Nx+Gd+NAC apresentou níveis pressóricos de $150 \pm 12,3$ mmhg. Apesar da queda dos níveis pressóricos no grupo Nx+Gd+NAC não houve diferença estatística em relação aos grupos anteriores ($p > 0,05$).

3.2.5. Cinética do Ferro

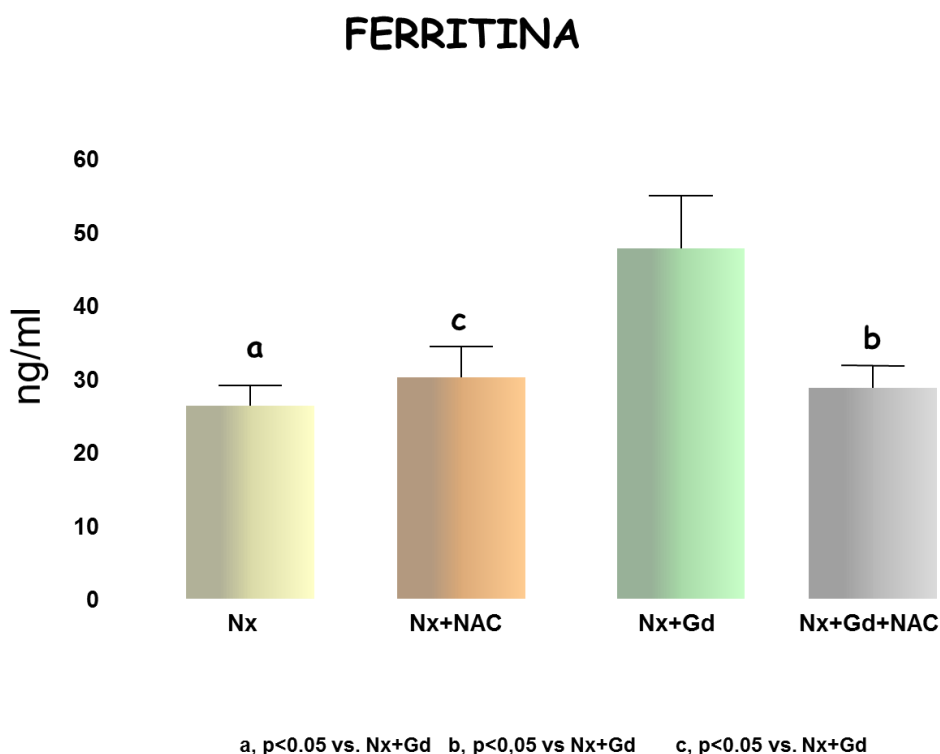
3.2.5.1 Ferro sérico

O grupo Nx+Gd apresentou níveis de ferro sérico de 87 ± 7 µg/dl. O grupo Nx apresentou níveis de ferro sérico de 65 ± 11 µg/dl, o grupo Nx+NAC $60 \pm 4,1$ µg/dl enquanto o grupo Nx+Gd+NAC apresentou níveis de ferro de 76 ± 15 µg/dl. Não houve diferença estatística entre os grupos com relação a dosagem do ferro sérico ($p > 0,05$).

3.2.5.2 Ferritina sérica

O grupo Nx+Gd apresentou níveis de ferritina de 47.7 ± 7.2 ng/dl, o grupo Nx 26.3 ± 2.5 ng/dl e o grupo Nx+NAC $30 \pm 4,1$ ng/d ($p < 0,05$). O grupo Nx+Gd+NAC apresentou níveis de ferritina sérica de 28.6 ± 3.1 ng/dl semelhantes ao grupo Nx e Nx+NAC, porém menores que o grupo Nx+Gd com significância estatística ($p < 0,05$), mostrando que o Gd eleva os níveis de ferritina nos ratos nefrectomizados com reversão após o uso do NAC. (Gráfico 3).

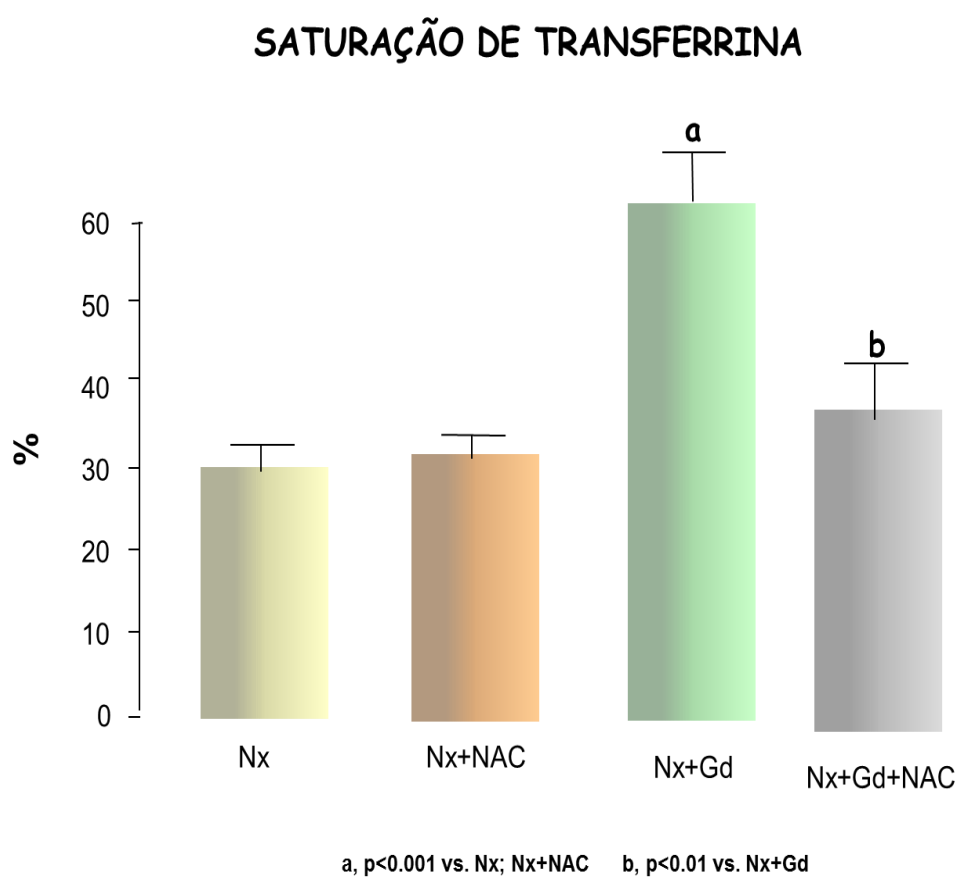
Gráfico 3: Dosagens de ferritina sérica dos grupos Nx, Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC. Os dados são expressos como média \pm EPM. **a** $p < 0,05$ vs Nx+Gd **b** $p < 0,05$ vs Nx+Gd; **c** $p < 0,05$ vs Nx+Gd.



3.2.5.3 Saturação de transferrina

O grupo Nx+Gd apresentou nível de saturação de transferrina significativamente maior do que os grupos Nx e Nx+NAC 48hs após a aplicação do Gadolínio. O grupo Nx+Gd apresentou nível médio de 51.6 ± 5.0 %, o grupo Nx 25.2 ± 2.7 % e o grupo Nx+NAC $26,7 \pm 2,4$ % ($p < 0,001$). O grupo Nx+Gd+NAC apresentou nível de saturação de 32.2 ± 5.6 %, semelhante aos grupos Nx e Nx+NAC, porém menor que o grupo Nx+Gd com significância estatística ($p < 0,01$). Os resultados mostraram uma elevação na saturação da transferrina relacionada à aplicação do Gd e reversão após o uso do NAC. (Gráfico 4).

Gráfico 4: Dosagem da saturação de transferrina nos grupos Nx, Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC. Os dados são expressos como média \pm EPM. **a** $p < 0,001$ vs Nx e Nx+NAC **b** $p < 0,01$ vs Nx+Gd;

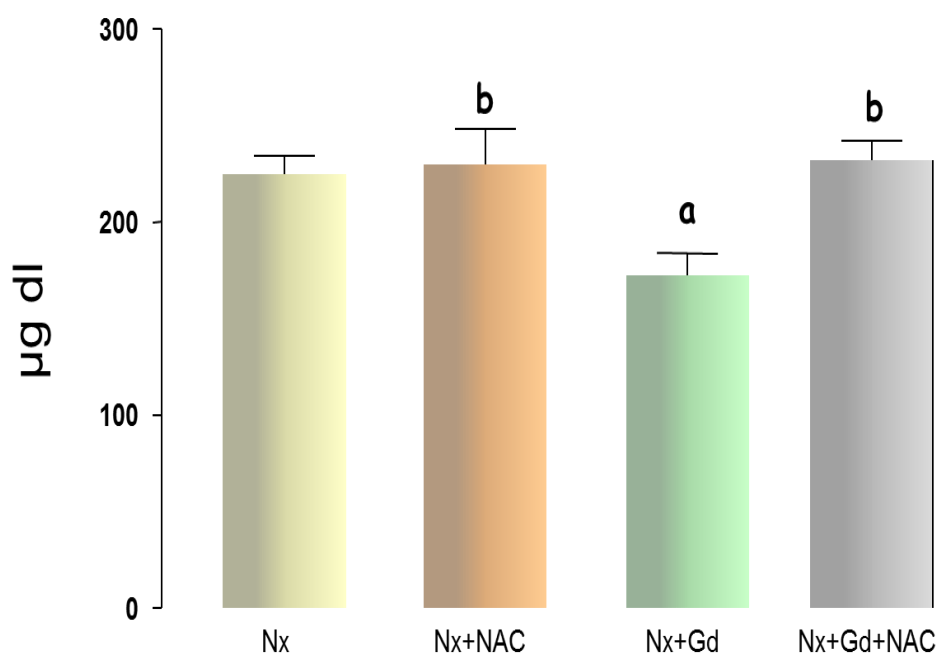


3.2.5.4 Capacidade total de ligação do ferro

O grupo Nx+Gd apresentou Capacidade total de ligação do ferro (CTLF) menor que os grupos Nx, Nx+NAC e Nx+Gd+NAC 48hs após a aplicação do Gadolínio. O grupo Nx+Gd apresentou CTLF média de 172 ± 12 g/dl, o grupo Nx 225 ± 10 g/dl e o grupo Nx+NAC $230 \pm 18,2$ g/dl ($p < 0,01$ e $p < 0,05$). O grupo Nx+Gd+NAC apresentou CTLF média de 232 ± 10 g/dl, semelhante aos grupos Nx e Nx+NAC, porém maiores que o grupo Nx+Gd com significância estatística ($p < 0,05$). Os resultados demonstram uma diminuição da CTLF associada ao Gd que foi revertida com o uso do NAC (Gráfico 5).

Gráfico 5: Dosagem da CTLF nos grupos Nx, Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC. Os dados são expressos como média \pm EPM. **a** $p < 0,01$ vs Nx e **b** $p < 0,05$ vs Nx+Gd;

Capacidade total de ligação do ferro

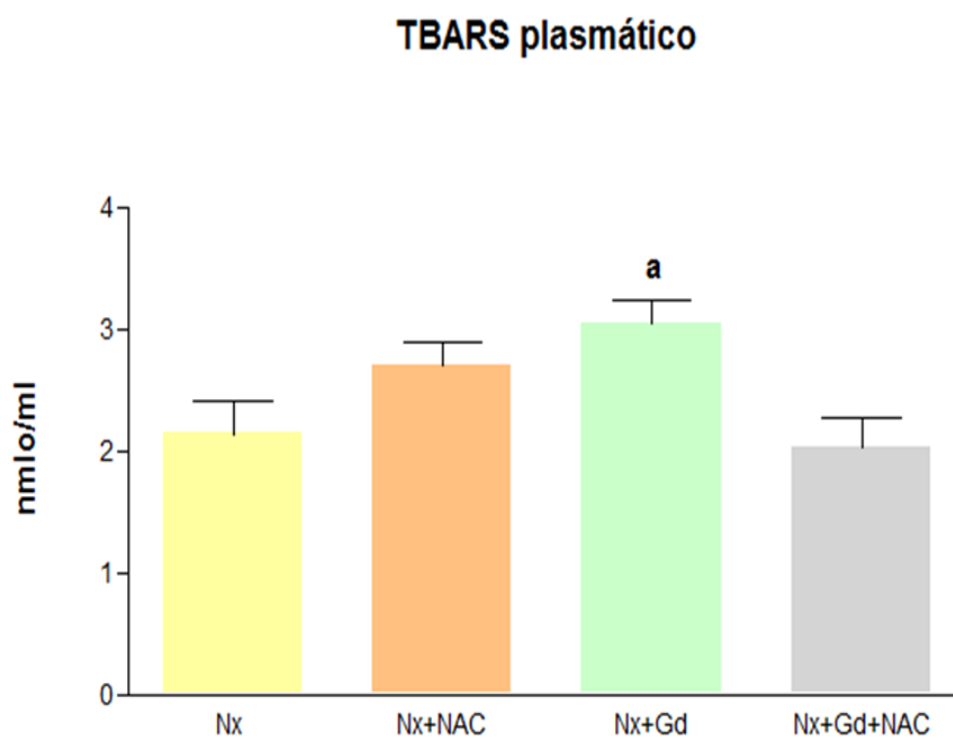


a, $p < 0.01$ vs. Nx b, $p < 0.05$ vs. Nx+Gd

3.3 TBARS plasmático

O grupo Nx+Gd apresentou níveis de TBARS plasmático maiores que o grupo Nx 48 hs após a aplicação do contraste. O grupo Nx+Gd apresentou níveis de $3,05 \pm 0,2$ nmol/ml enquanto o grupo Nx apresentou níveis de $2,2 \pm 0,28$ nmol/ml ($p < 0,05$). O grupo Nx+NAC apresentou níveis de $2,7 \pm 0,2$ nmol/ml sem diferença estatística entre os grupos Nx e Nx+Gd+NAC que apresentou níveis de $2,0 \pm 0,24$ nmol/ml semelhantes ao grupo Nx e menores que o grupo Nx+Gd ($p < 0,05$). Estes resultados podem indicar uma possível indução de stress oxidativo pelo Gd (gráfico 6).

Gráfico 6: Dosagem do TBARS plasmático nos grupos Nx, Nx+NAC, Nx+Gd e Nx+Gd+NAC. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs Nx+Gd;



a $p < 0,05$ vs Nx e Nx+Gd+NAC

4. Discussão

Nossos resultados mostraram que os animais nefrectomizados a 5/6 (Nx) submetidos à aplicação de gadolínio (grupo 3) apresentaram, 48hs após a aplicação do contraste, queda significativa da TFG e aumento da proteinúria em relação aos ratos controle (grupo 1). Além disso, foi observado nos ratos nefrectomizados que receberam o gadolínio (grupo 3) alterações significativas nos parâmetros de cinética do ferro. Houve um aumento na ferritina, no índice de saturação da transferrina e uma diminuição da capacidade total de ligação do ferro (CTLF) em relação aos ratos do grupo 1 com significância estatística. O uso de NAC em ratos nefrectomizados que receberam o gadolínio (grupo 4) impediu a queda da TFG gadolínio e manteve os parâmetros de cinética de ferro semelhantes ao do grupo controle.

O uso de NAC por curtos períodos em ratos nefrectomizados não alterou a TFG, proteinúria e parâmetros da cinética de ferro, pois todos os parâmetros avaliados foram semelhantes ao grupo controle (Nx). O objetivo do grupo Nx+NAC foi demonstrar que o efeito do NAC foi específico no grupo 3 (Nx+Gd). Optamos pelo modelo de DRC induzido pela nefrectomia 5/6 por ser um modelo estabelecido e utilizado com frequência em nosso laboratório de pesquisa e tempo pós nefrectomia (21 dias) utilizado para iniciar os estudos funcionais foi escolhido porque os ratos nesse período já apresentam disfunção renal que pode ser comparada a pacientes com DRC em estágios não muito avançados (estágios 2 e 3) onde ainda existem controvérsias sobre o uso do gadolínio e se a utilização de terapia profilática seria de benefício prático. Não seria interessante o estudo em ratos com função renal mais deteriorada porque o uso de contrastes paramagnéticos em pacientes com DRC em estágios avançados ou em terapia de substituição renal encontra-se bastante restrito por radiologistas e nefrologistas.

Estudos recentes, inclusive em humanos, já demonstram o potencial nefrotóxico do gadolínio. Em 2004, Erley *et al.* ²² publicaram um estudo prospectivo e randomizado em pacientes com creatinina sérica >1,5, mostrando uma queda da TFG em torno de 50% em metade dos pacientes expostos ao Gd comparado com 45% em pacientes que receberam contraste iodado. Em 2006, Briguori *et al.* ²³ em estudo retrospectivo com maior número de pacientes mostrou uma incidência de nefropatia por contraste associada ao Gd em torno de 28% comparados a apenas 6,5% em pacientes que receberam apenas contraste iodado. Em 2006, Ergun *et al.* ¹⁰ em estudo retrospectivo mostrou que a nefropatia após uso de Gd ocorreu em 12% dos pacientes estudados.

Durante muito tempo, não existiam evidências precisas do mecanismo de toxicidade dos meios de contraste baseados no Gd, mas após o surgimento da Fibrose Nefrogênica Sistêmica e dos estudos para entender a fisiopatogenia desta grave doença, a participação do stress oxidativo mediado pelo fenômeno da Transmetalção do gadolínio respondeu algumas dúvidas sobre a toxicidade associada ao contraste. A Transmetalção conforme discutido anteriormente se refere à capacidade de outros cátions do organismo (zinco, ferro, cobre e cálcio) em deslocar o gadolínio do seu quelante e liberá-lo em sua forma livre. Em 2007, Swaminathan *et al.* ⁷ demonstraram que a administração de Gd em pacientes com DRC e que desenvolveram Fibrose Nefrogênica Sistêmica (FNS) resulta em marcantes alterações em parâmetros da cinética do ferro com diminuição da CTLF, aumento da saturação da Transferrina e ferritina sérica com conseqüente mobilização do ferro corpóreo. Eles observaram que além da DRC, os pacientes que desenvolviam a FNS usavam altas dosagens de Eritropoetina, cargas aumentadas de

ferro corpóreo, PTH e níveis de inflamação sistêmica elevados, consistindo em fatores de risco para o desenvolvimento da FNS.

O ferro mobilizado, assim como o Gd em sua forma livre, pode ser tóxico para os tecidos através da indução de stress oxidativo mediada pela reação de Fenton. Portanto, evidências mais atuais mostram que a combinação do Gd em sua forma livre, o ferro catalítico liberado pela reação de Fenton gerando stress oxidativo e possivelmente fatores inflamatórios estariam implicados na fisiopatogenia da nefrotoxicidade relacionada ao Gd e no surgimento da FNS^{6,24,25}.

Essas evidências indicam que mais estudos são necessários para descobrir medidas profiláticas com relação à nefrotoxicidade do gadolínio e desenvolvimento da Fibrose Nefrogênica Sistêmica em pacientes com doença renal crônica²⁶. Conforme descrito anteriormente o uso do NAC em nosso trabalho foi justificado pela sua capacidade de combater o stress oxidativo gerado durante eventos de stress celular²⁷ descrito inclusive em atenuação de progressão da DRC em modelo experimental²⁸ e bastante utilizado como terapia profilática em trabalhos clínicos e modelos experimentais de nefropatia por contrastes iodados^{29,30}.

O TBARS é um método indireto para avaliar o stress oxidativo que representa de maneira quantitativa o resultado da interação entre radicais livres com a membrana celular configurando uma peroxidação lipídica. Estudos anteriores demonstraram níveis de TBARS aumentados na urina de ratos com DRC²⁷ na urina e plasma de pacientes com insuficiência renal crônica^{31,32} e em receptores de transplante renal com doador cadáver³³.

Em nosso estudo ocorreu elevação do TBARS plasmático no grupo Nx+Gd em comparação com o grupo controle, sugerindo indução de stress oxidativo pelo

gadolínio. A utilização do NAC reverteu essa elevação do TBARS atribuída ao contraste no grupo Nx+Gd+NAC indicando efeito antioxidante neste grupo que apresentou níveis de TBARS semelhantes ao grupo controle.

Entre as limitações do estudo podemos citar a necessidade de maior elucidação dos mecanismos envolvendo a Transmetalção com o stress oxidativo, os quais também não estão devidamente esclarecidos nas referências citadas. Outro ponto que pode ser mais explorado é possível atuação de fatores inflamatórios associados à toxicidade do contraste.

Baseado nos resultados do nosso estudo, demonstramos o potencial nefrotóxico do Gd em ratos com disfunção renal moderada e o efeito protetor do NAC que poderia ser utilizado, em estudos futuros, em pacientes com doença renal crônica que precisam ser submetidos aos mais variados tipos de exames de ressonância magnética com o objetivo de prevenir a toxicidade dos contrastes paramagnéticos inclusive em relação ao desenvolvimento da Fibrose Nefrogênica Sistêmica, consequência mais catastrófica da toxicidade do gadolínio.

5. Conclusões

Nossos resultados comprovam que os contrastes baseados no Gd tem um potencial nefrotóxico em ratos portadores de DRC moderada demonstrado pela queda na TFG 48 hs após a aplicação do contraste em relação a ratos controles e em concordância com a literatura mais atual, mostramos que o contraste promove em ratos com DRC uma mobilização do ferro corporal. Adicionalmente, demonstramos que a mesma dose de contraste utilizada em ratos normais não provocou alterações significativas na TFG, mostrando que a presença de DRC constitui um fator de risco importante para a toxicidade relacionada ao Gd.

Acreditamos que nosso principal resultado foi a capacidade do NAC em prevenir a piora na TFG dos ratos com DRC que receberam o Gd e impedir a mobilização do ferro corporal por um provável bloqueio da Transmetalção via reação de Fenton pela sua capacidade antioxidativa.

6. Referências Bibliográficas

1. Perazella MA, Rodby RA. Gadolinium use in patients with kidney disease: a cause for concern. *Semin Dial.* 2007 jun;20(3):179–85.
2. Swan SK, Lambrecht LJ, Townsend R, Davies BE, McCloud S, Parker JR, et al. Safety and pharmacokinetic profile of gadobenate dimeglumine in subjects with renal impairment. *Invest Radiol.* 1999 jul;34(7):443–8.
3. Hamm B, Staks T, Mühler A, Bollow M, Taupitz M, Frenzel T, et al. Phase I clinical evaluation of Gd-EOB-DTPA as a hepatobiliary MR contrast agent: safety, pharmacokinetics, and MR imaging. *Radiology.* 1995 jun;195(3):785–92.
4. Joffe P, Thomsen HS, Meusel M. Pharmacokinetics of gadodiamide injection in patients with severe renal insufficiency and patients undergoing hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Acad Radiol.* 1998 jul;5(7):491–502.
5. Penfield JG, Reilly RF Jr. What nephrologists need to know about gadolinium. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007 dez;3(12):654–68.
6. Ersoy H, Rybicki FJ. Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *J Magn Reson Imaging.* 2007 nov;26(5):1190–7.
7. Swaminathan S, Horn TD, Pellowski D, Abul-Ezz S, Bornhorst JA, Viswamitra S, et al. Nephrogenic systemic fibrosis, gadolinium, and iron mobilization. *N. Engl. J. Med.* 2007 ago 16;357(7):720–2.

8. Hammer FD, Goffette PP, Malaise J, Mathurin P. Gadolinium dimeglumine: an alternative contrast agent for digital subtraction angiography. *Eur Radiol.* 1999;9(1):128–36.
9. Prince MR, Arnoldus C, Frisoli JK. Nephrotoxicity of high-dose gadolinium compared with iodinated contrast. *J Magn Reson Imaging.* 1996 fev;6(1):162–6.
10. Ergün I, Keven K, Uruç I, Ekmekçi Y, Canbakan B, Erden I, et al. The safety of gadolinium in patients with stage 3 and 4 renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006 mar;21(3):697–700.
11. Sam AD 2nd, Morasch MD, Collins J, Song G, Chen R, Pereles FS. Safety of gadolinium contrast angiography in patients with chronic renal insufficiency. *J. Vasc. Surg.* 2003 ago;38(2):313–8.
12. Akgun H, Gonlusen G, Cartwright J Jr, Suki WN, Truong LD. Are gadolinium-based contrast media nephrotoxic? A renal biopsy study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2006 set;130(9):1354–7.
13. Kwak H-S, Lee Y-H, Han Y-M, Jin G-Y, Kim W, Chung G-H. Comparison of renal damage by iodinated contrast or gadolinium in an acute renal failure rat model based on serum creatinine levels and apoptosis degree. *J. Korean Med. Sci.* 2005 out;20(5):841–7.
14. Thomsen HS, Almèn T, Morcos SK. Gadolinium-containing contrast media for radiographic examinations: a position paper. *Eur Radiol.* 2002 out;12(10):2600–5.

15. Tepel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N. Engl. J. Med.* 2000 jul 20;343(3):180–4.
16. Skrzydlewska E, Farbiszewski R. Protective effect of N-acetylcysteine on reduced glutathione, reduced glutathione-related enzymes and lipid peroxidation in methanol intoxication. *Drug Alcohol Depend.* 1999 nov 1;57(1):61–7.
17. Boesgaard S, Aldershvile J, Poulsen HE, Christensen S, Dige-Petersen H, Giese J. N-acetylcysteine inhibits angiotensin converting enzyme in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993 jun;265(3):1239–44.
18. Conesa EL, Valero F, Nadal JC, Fenoy FJ, López B, Arregui B, et al. N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001 set;281(3):R730–7.
19. Vorobiov M, Basok A, Tovbin D, Shnaider A, Katchko L, Rogachev B. Iron-mobilizing properties of the gadolinium-DTPA complex: clinical and experimental observations. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003 maio;18(5):884–7.
20. Pietsch H, Lengsfeld P, Steger-Hartmann T, Löwe A, Frenzel T, Hütter J, et al. Impact of renal impairment on long-term retention of gadolinium in the rodent skin following the administration of gadolinium-based contrast agents. *Invest Radiol.* 2009 abr;44(4):226–33.

21. Hope TA, High WA, Leboit PE, Chaopathomkul B, Rogut VS, Herfkens RJ, et al. Nephrogenic systemic fibrosis in rats treated with erythropoietin and intravenous iron. *Radiology*. 2009 nov;253(2):390–8.
22. Erley CM, Bader BD, Berger ED, Tuncel N, Winkler S, Tepe G, et al. Gadolinium-based contrast media compared with iodinated media for digital subtraction angiography in azotaemic patients. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2004 out;19(10):2526–31.
23. Briguori C, Colombo A, Airoidi F, Melzi G, Michev I, Carlino M, et al. Gadolinium-based contrast agents and nephrotoxicity in patients undergoing coronary artery procedures. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2006 fev;67(2):175–80.
24. Idée J-M, Port M, Raynal I, Schaefer M, Le Greneur S, Corot C. Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. *Fundam Clin Pharmacol*. 2006 dez;20(6):563–76.
25. Tweedle MF, Hagan JJ, Kumar K, Mantha S, Chang CA. Reaction of gadolinium chelates with endogenously available ions. *Magn Reson Imaging*. 1991;9(3):409–15.
26. Ledneva E, Karie S, Launay-Vacher V, Janus N, Deray G. Renal safety of gadolinium-based contrast media in patients with chronic renal insufficiency. *Radiology*. 2009 mar;250(3):618–28.

27. Heyman SN, Rosen S, Khamaisi M, Idée J-M, Rosenberger C. Reactive oxygen species and the pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy. *Invest Radiol.* 2010 abr;45(4):188–95.
28. Shimizu MHM, Coimbra TM, de Araujo M, Menezes LF, Seguro AC. N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. *Kidney Int.* 2005 nov;68(5):2208–17.
29. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003 jan;60(1):6–20.
30. Drager LF, Andrade L, Barros de Toledo JF, Laurindo FRM, Machado César LA, Seguro AC. Renal effects of N-acetylcysteine in patients at risk for contrast nephropathy: decrease in oxidant stress-mediated renal tubular injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004 jul;19(7):1803–7.
31. Cvetković T, Mitić B, Lazarević G, Vlahović P, Antić S, Stefanović V. Oxidative stress parameters as possible urine markers in patients with diabetic nephropathy. *J. Diabetes Complicat.* 2009 out;23(5):337–42.
32. Trimarchi H, Mongitore MR, Baglioni P, Forrester M, Freixas EAR, Schropp M, et al. N-acetylcysteine reduces malondialdehyde levels in chronic hemodialysis patients--a pilot study. *Clin. Nephrol.* 2003 jun;59(6):441–6.
33. Danilovic A, Lucon AM, Srougi M, Shimizu MHM, Ianhez LE, Nahas WC, et al. Protective effect of N-acetylcysteine on early outcomes of deceased renal transplantation. *Transplant. Proc.* 2011 jun;43(5):1443–9.